

Estudio fisiológico de *Dinophysis* spp. durante un ciclo de afloramiento/hundimiento en la Ría de Pontevedra



Sonsoles González-Gil, Lourdes Velo, Isabel Ramilo y Beatriz Reguera

Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Aptdo 1552, 36280 Vigo, Spain



RESUMEN- Durante la campaña multidisciplinaria HABIT 2005 (Ría de Pontevedra, Galicia), se realizaron observaciones morfológicas en poblaciones de *Dinophysis* spp. para analizar *in situ* el estado fisiológico de sus poblaciones (presencia o ausencia de depósitos de almidón, formación de vacuolas, estimaciones de tasa de división, mediciones morfométricas y autofluorescencia). Se encontraron evidencias de mixotrofia tanto en *D. rotundata* (heterótrofo) como en *D. acuminata*. En esta última, se detectó un mayor acúmulo de depósitos de almidón al principio del pulso de afloramiento, de vacuolas digestivas durante la relajación y de gránulos refringentes y células parasitadas durante el hundimiento. Se ilustran los distintos estados fisiológicos en relación con el pulso de afloramiento/hundimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Muestreo realizado durante la campaña HABIT 2005 (30 mayo - 14 junio de 2005) en Ría de Pontevedra. Para la presentación de resultados se escogió la estación Boca Norte (P5) (Figura 1).
- Se seleccionó la fracción de 20-77 μ m en muestras tomadas con bomba peristáltica, que se fijaron con lugol o formal según objetivos. Se estimó el porcentaje de células con almidón y con vacuolas contando un mínimo de 100 células por muestra.
- Las medidas morfométricas se realizaron utilizando el programa informático Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).
- La tinción del DNA se realizó con el fluorocromo SyBrGreen (Molecular Probes, Oregon). Las muestras se observaron bajo un microscopio invertido Nikon Eclipse 2000 con filtro azul (Ex 450/490 nm, Em 520 nm LP). Todas las fotos se hicieron con una cámara Nikon D70 a 10x y 40x.
- Las tasas de división *in situ* se hicieron según el método del índice mitótico de acuerdo con Reguera et al. (2003).



Fig 6- Porcentaje de células de *D. acuminata* con vacuolas digestivas en la estación Boca Norte a lo largo de Junio de 2005.

El mayor porcentaje de células con vacuolas digestivas se detectó el día 8 de Junio, coincidiendo con una relajación del afloramiento.

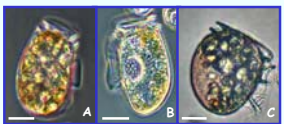


Fig 8 - Distribución y tamaño de las vacuolas en *D. acuminata* y *D. rotundata*. (A) célula de *D. acuminata* con vacuolas digestivas, (B) sin vacuolas, (C) célula de *D. rotundata* llena de vacuolas digestivas. Barra = 20 μ m. El tamaño medio de las vacuolas es (LxW) = 5.66 x 5.51 μ m, n= 67 y 7.60x7.48 μ m, n= 73 respectivamente.

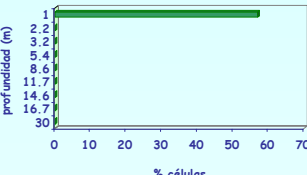


Fig 7- Perfil vertical del porcentaje de células vacuoladas de *D. acuminata* en la Boca Norte, el día 8 de Junio de 2005.

El mayor porcentaje de células vacuoladas de *D. acuminata* se encuentra a 1 m (56.85%).

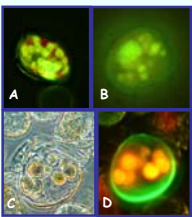


Fig 9- Vacuolas digestivas en *Dinophysis* spp. (A, B). Vacuolas de *D. acuminata* (A) y *D. rotundata* (B) mostrando restos de DNA, teñidos con SybrGreen, en su interior. (C, D) Vacuolas de *D. rotundata* con una intensa autofluorescencia naranja similar a la de la ficoeritrina.

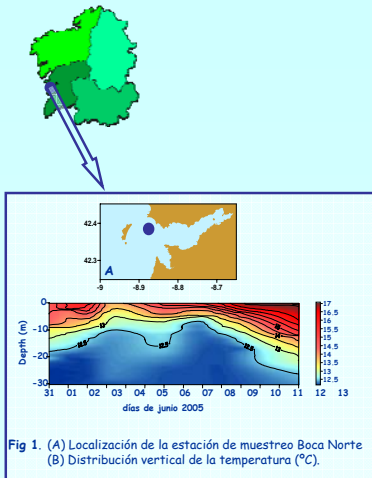


Fig 1. (A) Localización de la estación de muestreo Boca Norte (B) Distribución vertical de la temperatura (°C).

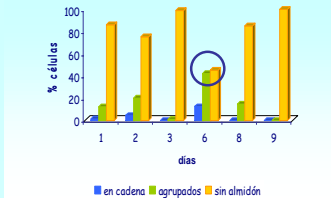


Fig 2- Porcentaje de células con depósitos de almidón en la estación Boca Norte a lo largo de Junio de 2005.

El mayor porcentaje de células con acúmulos de almidón se detectó el 6 de Junio, coincidiendo con una entrada de agua fría (12°C) en la ría.

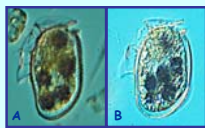


Fig 3- Distribución y tamaño de los gránulos de almidón en *D. acuminata*. (A) en forma de cadena, (B) de forma agrupada. Su tamaño medio es (LxW) = 7.55 x 7.37 μ m, n= 38

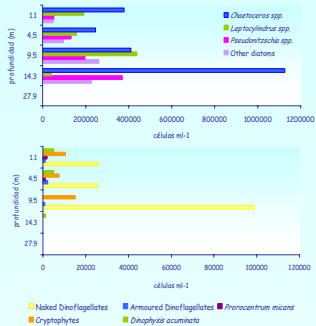


Fig 5- Distribución vertical de especies presentes en la Boca Norte el día 6 de Junio de 2005.

- La mayor concentración de *D. acuminata* se da en los primeros metros de la columna, con valores aproximados de 5100 células ml⁻¹.
- Las especies acompañantes son principalmente diatomeas del género *Chaetoceros* y *Leptocylindrus*.

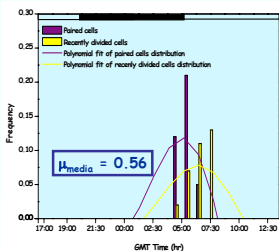


Fig 10- Ciclo celular y patrón de división de *D. acuminata* durante un ciclo de 24 hr el 13-14 de junio. La barra negra horizontal indica el periodo entre el amanecer y el ocaso.

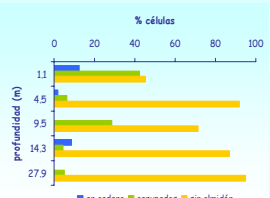


Fig 4- Perfil vertical del porcentaje de células con acúmulos de almidón en la Boca Norte, el 6 de Junio de 2005.

El mayor porcentaje de células con acúmulos de almidón se detectó en la capa superficial (0-2m) (54.81% a 1.1 m)

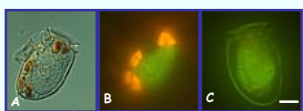


Fig 11- (A) *D. acuminata* albergando un parásito en su interior. (B) epifluorescencia de la misma célula. (C) célula fijada con glutaraldehído y teñida con SybrGreen, mostrando el característico núcleo puntuado de los parásitos (Solomon et al. 2003). Barra = 20 μ m

BIBLIOGRAFÍA

Solomon et al. (2003). Environ. Microb. 5: 1046-1052
Reguera et al. (2003). MEPS 249: 117-131

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- > Los mayores porcentajes de *D. acuminata* con depósitos de almidón se detectaron en la estación más externa de la Ría de Pontevedra (Boca Norte) (Fig 2), el 6 de Junio, cuando los pulsos de afloramiento eran intensos (Fig 1). El mayor porcentaje de células con almidón se observó en la capa superficial (0-5m) de agua (Fig 4).
- > La comunidad fitoplanctónica el 6 de junio en la Boca Norte estaba compuesta principalmente por diatomeas del género *Chaetoceros* y *Leptocylindrus*. La concentración de *D. acuminata* era de unas 5100 cells/ml distribuidas verticalmente en los primeros cinco metros de la columna de agua (Fig 5).
- > La distribución celular de los depósitos de almidón en *D. acuminata* presentó dos patrones de agrupación: en forma de cadena y en racimos (Fig 3). El tamaño medio de los gránulos de almidón fue L= 7.55±1.59, W = 7.37±1.47 μ m. Se observó la presencia de un parásito en *D. acuminata* durante el ciclo de 24 hr (Fig.11) al final de la campaña.
- > La mayor concentración de células vacuoladas se encontró el 8 junio (Fig 6), durante la relajación (ver Fig 1). Las vacuolas de *D. acuminata* eran menores que las de *D. rotundata* (L = 5.66±1.62, W = 5.51±1.38 μ m y L = 7.60±1.89, W = 7.48±1.82 μ m respectivamente) (Fig. 8). Algunas vacuolas digestivas de *D. acuminata* se tiñeron positivamente con el fluorocromo SyBrGreen, indicando la presencia de ácidos nucleicos en su interior (Fig 9A). Algunas vacuolas encontradas en el heterótrofo *D. rotundata* mostraron restos de DNA (Fig. 9B) y en otros casos, una intensa autofluorescencia naranja (ficoeritrinas) (Fig 9C, D). Esta última observación indica que NO SIEMPRE la detección de estos pigmentos en *Dinophysis* spp. constituye un hipotético paso previo a la cleptoplastidial. La tasa de división intrínseca (μ_{min} y μ) reveló un crecimiento moderado durante los días 3 (afloramiento) y 9 (relajación) (μ_{min} hasta 0.16 d⁻¹), y un crecimiento máximo durante el ciclo de 24 horas (13-14 junio) durante el hundimiento (μ_{min} = 0.25 d⁻¹; μ = 0.56 d⁻¹) (Fig 10).
- > Se observó una evolución de células de pequeño tamaño no vacuoladas (inicio del afloramiento) a células de mayor tamaño y vacuoladas (relajación) y finalmente células con cuerpos refringentes (hundimiento) a lo largo de la campaña. Estas células de mayor tamaño se concentraban generalmente en superficie. La vacuolación puede representar una estrategia para incrementar el tamaño de una población que se encuentre depauperada.

Estos resultados muestran un acoplamiento entre la variabilidad del comportamiento nutricional de *D. acuminata* y las distintas fases de los pulsos de afloramiento/hundimiento que indican el uso de distintos modos de nutrición.